

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.818.018.599.323.4

В.М. Черток¹, А.Е. Коцюба¹ и Е.П. Коцюба²

СЕРТОНИН- И НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ В ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА У КРЫС

¹ Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.М. Черток), Владивостокский государственный медицинский университет;

² лаборатория гистофизиологии (зав. — канд. биол. наук М.А. Ващенко), Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток, e-mail: akotc@mail.ru

Цель работы — топохимическое картирование серотонин- и нитроксидаергических нейронов у 12 крыс линии Вистар в 8 ядрах продолговатого мозга, относящихся к так называемому «бульбарному вазомоторному центру». Установлено, что доля серотонинергических нейронов, находящихся в проекции изученных ядер, в среднем составляет 12–15%, а в ядрах задней группы шва возрастает до 31–43%. Нитроксидаергические нейроны распределены более равномерно, а их доля в разных ядрах колеблется от 19 до 49%. Между ядрами, ядрами и проводящими путями выявлены 2–6% нейронов, которые предположительно выполняют интегративные функции в регуляции гемодинамики.

Ключевые слова: продолговатый мозг, ядра, серотонинергические и нитроксидаергические нейроны, топохимическое картирование

Организация серотонинергических (СЕН) и нитроксидаергических нейронов (НЕН) в продолговатом мозгу вызывает противоречивые оценки. Противоречия касаются как локализации и количественного распределения нейронов в нервных центрах [9, 15, 19], так и физиологической роли выделяемых ими нейротрансмиттеров в работе ЦНС, в том числе и в центральной регуляции гемодинамики [2].

Цель настоящей работы — топохимическое картирование СЕН и НЕН в некоторых ядрах продолговатого мозга крысы, участвующих в функциях бульбарного отдела вазомоторного центра.

Материал и методы. Исследование выполнено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) на материале, полученном от 12 крыс линии Вистар массой 200–250 г, содержавшихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Животных умерщвляли путем внутривенного введения раствора нембутала (5 мг на 100 г массы), из полости черепа извлекали головной мозг, отделяли от него продолговатый мозг, который фиксировали при 4 °С в течение 4 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1 М натрийфосфатном буфере (рН 7,4), а затем в течение 24 ч промывали в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Фиксированный материал пропитывали в холодном 30% растворе сахарозы на 0,1 М фосфатном буфере, готовили криостатные срезы толщиной 30–40 мкм, которые обрабатывали для иммуноцитохимического выявления СЕН [7] и гистохимического — НЕН [16]. Контроль специфичности реакции в первом случае проводили путем исключения стадии инкубирования в специфической и нормальной кроличьей антисыворотке, во втором — инкубацией нескольких срезов в растворе, содержащем NADP вместо NADPH.

Изучали ядро солитарного тракта (ЯСТ), дорсальное ядро блуждающего нерва (ДЯБН), а также ретикулярные ядра — латеральное (РЛЯ), гигантоклеточное (РГЯ), мелкоклеточное (РМЯ) и ядра шва задней группы — бледное (БЯШ), темное (ТЯШ) и крупное (КЯШ). Для уточнения границ ядер использовали атлас мозга крысы [18]. В серии из последовательных срезов продолговатого мозга один — окрашивали 0,5% раствором метиленового синего по Нисслю, другой — обрабатывали для выявления НЕН, третий — СЕН. Для более точного определения пространственной локализации нейронов в исследованных ядрах каждый из трех срезов исследовали отдельно в трех микроскопах, в окуляры которых помещали одинаковые сетки с равновеликими квадратами. Каждое ядро ориентировали по характерным признакам в сагиттальной и фронтальной плоскостях, после чего его контуры воспроизводили на экране монитора в соответствии с положением ядер относительно координат сетки.

В каждом ядре определяли среднюю площадь профильного поля нейронов (мкм²), их абсолютное (общее) число в проекции среза ядра, долю, приходящуюся отдельно на СЕН и НЕН. Кроме того, вычисляли количество клеток в 0,01 мм³ ядра (относительную плотность) и показатель оптической плотности преципитата (ОПП) в нейронах. Для определения ОПП изображение срезов переносили на экран компьютера и вводили в окно программы Allegro-MS. При помощи морфометрической «маски» выделяли все НЕН, находящиеся в проекции среза исследуемого ядра. Затем автоматически вычисляли величину ОПП по сумме яркости пикселей при сканировании профиля каждого нейрона с последующим вычислением уровня средней яркости пикселей во всех НЕН исследуемого ядра в соответствии с алгоритмом, описанным ранее [1]. Активность NO-синтазы (NOS) выражали в условных единицах оптической плотности. Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных от каждого животного при обработке не менее 12 срезов с двух уровней продолговатого мозга (рис. 1, а, б). Для оценки значимости цифровых данных применяли *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при *P* < 0,05.

Результаты исследования. СЕН и НЕН определяются в составе всех изученных нами ядер (см. рис. 1, 2). Большинство тел нейронов имеют овальную, веретеновидную или треугольную форму, реже выявляются полигональные клетки. Независимо от формы клетки имеют малую (5–10 мкм), среднюю (13–20 мкм) или большую (24–32 мкм) величину. В вентрокаудальной части РГЯ встречаются очень крупные (свыше 40–45 мкм) мультиполярные клетки, так называемые гигантские нейроны. Подсчеты показали, что при окраске препаратов метиленовым синим относительное содержание мелких, средних и крупных нейронов в исследованных ядрах неодинаково. Численная плотность первых колеблется в пределах 22–29%, вторых — 45–56%, третьих — 16–28%. Однако в ЯСТ, РЛЯ и РМЯ высока доля мелких нейронов (около 36–45%), поэтому средняя площадь сечения тел клеток в них наименьшая, в РГЯ более 7% составляют гигантские нейроны, за счет которых значения показателя становится выше, чем в других ядрах ($P < 0,05$). СЕН обычно имеют более крупные размеры (на 5–9%), чем НЕН.

В ядрах находится различное число нейронов (см. рис. 2, а–в), но во всех случаях клеток, окрашенных метиленовым синим, в несколько раз больше, чем СЕН или НЕН (рис. 3, а). Последних в ЯСТ почти в 2, а в РЛЯ, РГЯ, РМЯ в 2,5–3 раза больше, чем аккумулирующих серотонин ($P < 0,05$). В ДЯБН и ядрах шва количество обеих групп нейронов значимо не различается ($P > 0,05$). Важно отметить, что количественное соотношение СЕН или НЕН в ядрах не всегда пропорционально числу клеток, выявленных метиленовым синим. Так, в ЯСТ при относительно высоких цифрах общего количества клеток число СЕН — минимальное, тогда как в ядрах шва наблюдается обратная зависимость. В РГЯ и РМЯ определяются одинаково большие количества НЕН, тогда как показатели абсолютного количества клеток, окрашенных метиленовым синим, значимо различаются ($P < 0,05$). В связи с этим доля как СЕН, так и НЕН в исследованных ядрах имеет существенные различия (см. рис. 3, б). В ядрах шва доля СЕН в 2–3 раза выше, чем в ретикулярных ядрах и ЯСТ. Иная зависимость выявлена при подсчетах НЕН: наибольшие значения доли этих клеток определяются в РЛЯ, РГЯ и РМЯ, наименьшие — в ЯСТ и ДЯБН ($P < 0,05$).

Между ядрами выявлены весьма существенные различия относительной плотности расположения нейронов, значения которой зависят не только от абсолютного количества клеток, но и от размеров нейронов, а также расстояния между

ними (см. рис. 3, в). Так, при окраске препаратов метиленовым синим в РМЯ, РЛЯ и ЯСТ определяются компактные группы небольших клеток, поэтому цифры относительной плотности расположения клеток в них выше, чем в других исследованных ядрах ($P < 0,05$). В ядрах шва определяются наиболее низкие значения. Между остальными ядрами различия величины показателя не значимы ($P > 0,05$). При изучении НЕН наиболее высокие цифры относительной плотности их расположения определяются в РЛЯ и РМЯ, низкие — в ДЯБН и ЯСТ ($P < 0,05$). У СЕН самые большие значения этого показателя выявлены в двух ядрах шва (КЯШ и ТЯШ) и РГЯ. Наименьшая величина показателя установлена в ДЯБН и ЯСТ ($P < 0,05$).

Как НЕН, так и СЕН различаются структурой и плотностью выпавшего осадка, в результате чего преципитат занимает большую или меньшую часть цитоплазмы клеток (рис. 4). В нейронах с низкой интенсивностью реакции преципитат маркирует лишь контуры клетки, оставляя свободной большую часть цитоплазмы. Такие клетки встречаются чаще среди нейронов небольшого размера.

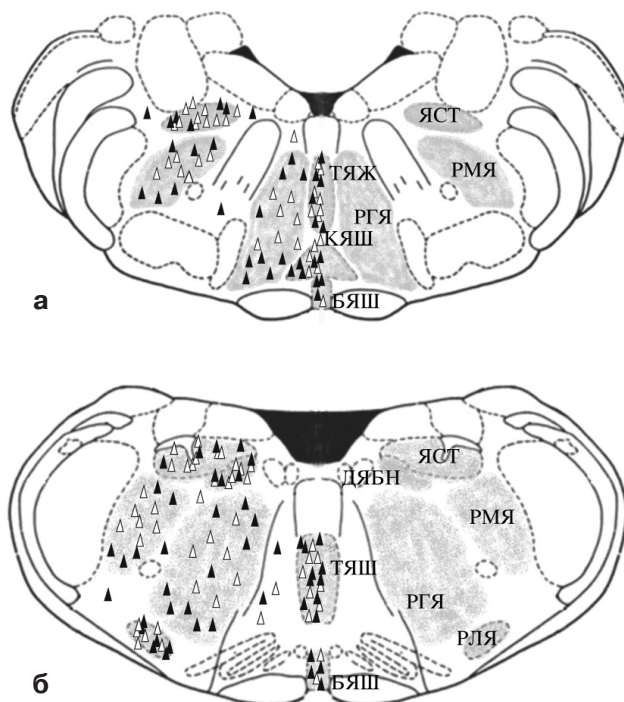


Рис. 1. Распределение нейронов в некоторых ядрах продолговатого мозга крысы.

а — роstralная часть (11,3 мм от Bregma); б — каудальная часть (12,8 мм от Bregma). Треугольники черного цвета — нитросергические нейроны; светлые треугольники — серотонинергические нейроны; ЯСТ — ядро солитарного тракта; ДЯБН — дорсальное ядро блуждающего нерва; РЛЯ — ретикулярное латеральное ядро; РГЯ — ретикулярное гигантоклеточное ядро; РМЯ — ретикулярное мелкоклеточное ядро; БЯШ — бледное ядро шва; ТЯШ — темное ядро шва; КЯШ — крупное ядро шва.

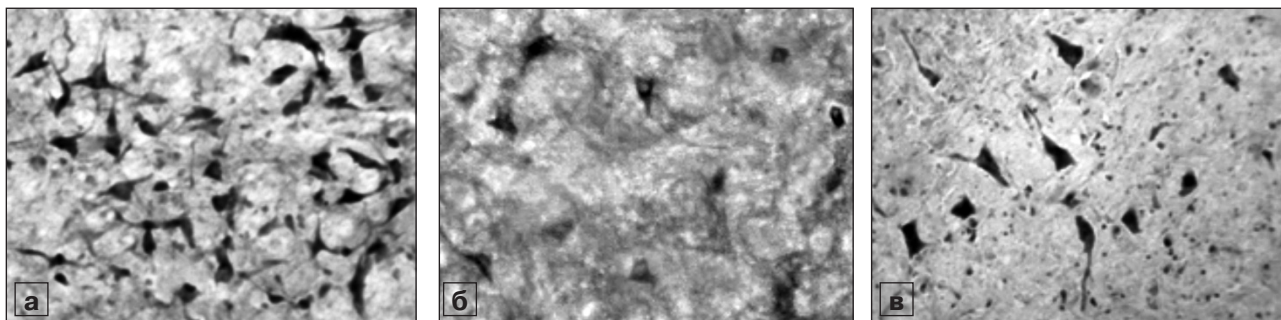
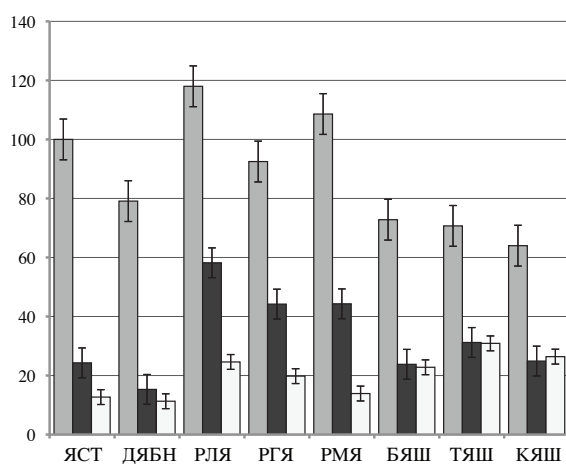
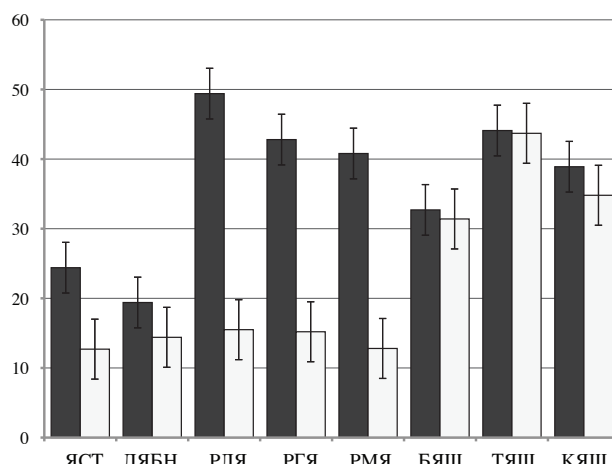


Рис. 2. Нейроны бледного ядра шва мозга крысы.

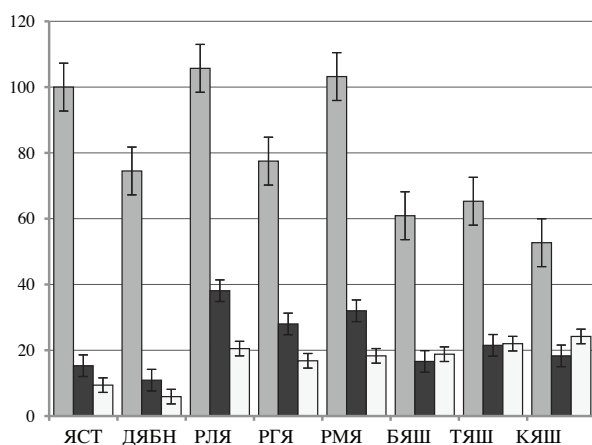
а — нейроны, окрашивающиеся метиленовым синим; б — нитроксидергические нейроны; в — серотонинергические нейроны. а — окраска по Нисслю; б — метод В.Т. Норе и S.R. Vincent [16]; в — иммуноцитохимический метод. Об 10, ок. 10.



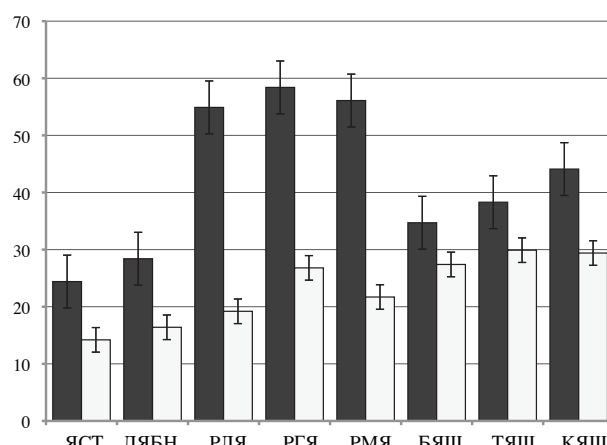
а



б



в



г

Рис. 3. Количественная характеристика нитроксидергических — НЕН (черные столбики), серотонинергических — СЕН (светлые столбики) и окрашенных метиленовым синим (серые столбики) нейронов в ядрах продолговатого мозга крысы.

По горизонтальным осям — ЯСТ — ядро солитарного тракта; ДЯБН — дорсальное ядро блуждающего нерва; ретикулярные ядра: РЛЯ — латеральное, РГЯ — гигантоклеточное, РМЯ — мелкоклеточное; ядра шва: БЯШ — бледное, ТЯШ — темное, КЯШ — крупное; по осям ординат: а — доля различных нейронов (за 100% принято количество всех нейронов в ЯСТ, окрашивающихся метиленовым синим); б — доля НЕН и СЕН от общего количества нейронов, окрашивающихся метиленовым синим, принятого за 100%, в соответствующих ядрах; в — относительная плотность расположения нейронов (в $0,01 \text{ мм}^3$ ядра) (за 100% принята относительная плотность нейронов в ЯСТ, окрашенных метиленовым синим); г — оптическая плотность преципитата (усл. ед). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

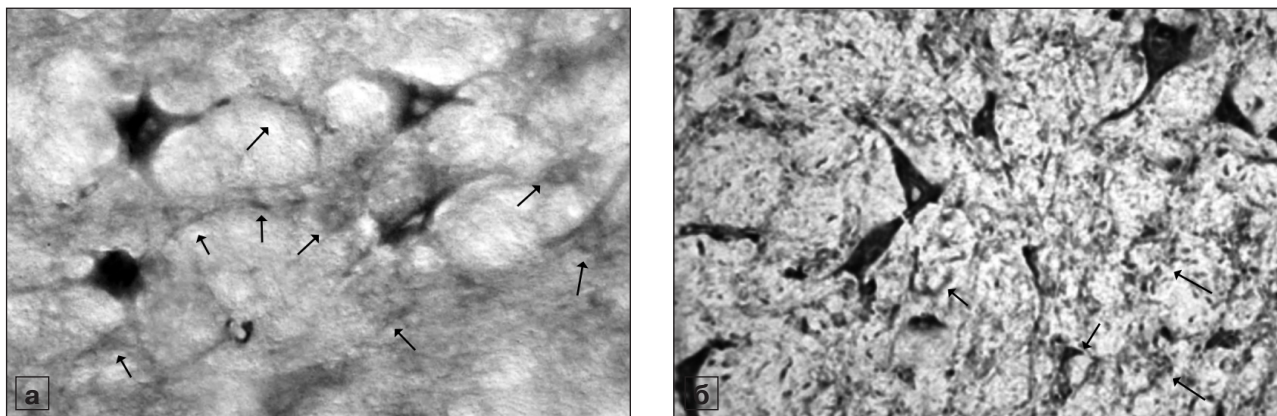


Рис. 4. Нейроны с разной степенью активности фермента.

а — нитроэргические нейроны; б — серотонинэргические нейроны. Стрелки — нейроны со слабой активностью фермента. а — метод В.Т. Норе и S.R. Vincent [16]; б — иммуноцитохимический метод. Об. 20, ок. 10.

Поэтому там, где мелких клеток больше (ЯСТ, ДЯБН), средний показатель оптической плотности осадка как среди СЕН, так и НЕН, обычно меньше, чем в ядрах, в которых выше содержание более крупных клеток (см. рис. 3, г). В нейронах со средней и высокой интенсивностью реакции преципитат заполняет большую часть цитоплазмы, распространяясь, нередко, и на отростки клеток. Среди СЕН таких клеток много в ядрах шва и РГЯ, где определяется наибольшая величина средней ОПП ($P < 0,05$). НЕН со средней и высокой активностью больше всего в РЛЯ, РГЯ и РМЯ, где их количество составляет более половины всех клеток, поэтому в этих ядрах средний показатель активности фермента выше, чем в других ядрах ($P < 0,05$).

Между ядрами, а также ядрами и проводящими путями выявляются одиночные СЕН и НЕН звездчатой или веретеновидной формы (см. рис. 1; 2, а, б). Это небольшие клетки площадью около $100\text{--}180\text{ мкм}^2$ с высокой или умеренной плотностью отложения продукта реакции. Доля таких нейронов колеблется от 2 до 6% от общего числа клеток. Особенно часто они наблюдаются в дорсо-медиальной части продолговатого мозга на стыке РГЯ и РМЯ, по границе РГЯ с медиальной петлей, ядром лицевого нерва и вестибулоспинальным трактом, несколько реже — в области ЯСТ и на периферии РЛЯ.

Обсуждение полученных данных. Современными исследователями серотонин рассматривается в качестве одного из важнейших участников центральной регуляции функций сердечно-сосудистой системы [2, 5, 8]. Однако гемодинамические эффекты этого моноамина во многом зависят от взаимодействия в мозгу СЕН и НЕН, поскольку NO обладает способностью

регулировать выделение различных медиаторов, включая серотонин [6]. Проведенное нами топохимическое и количественное исследование СЕН и НЕН в ядрах, участвующих в центральной регуляции кровообращения, свидетельствует в пользу такого предположения. Во всех исследованных ядрах продолговатого мозга, наряду с СЕН, постоянно определяются НЕН, количество которых в 2–3 раза больше, чем СЕН. При этом не менее половины НЕН в ретикулярных ядрах составляют клетки с высокой и умеренной активностью NOS — фермента, участвующего в синтезе NO.

Присутствие серотонина в нейронах ствола мозга впервые продемонстрировали А. Dahlsrom и К. Fuxe [13]. В ядрах шва ими были описаны небольшие клеточные скопления, люминесцирующие желтым светом и по этому признаку отнесенные к СЕН. Вместе с тем, по данным биохимических исследований [10], концентрация серотонина в продолговатом мозгу намного выше той, которую по расчетам могут обеспечить все СЕН, выявленные скандинавскими исследователями в этом отделе мозга. Вполне вероятно, причины расхождений связаны с тем, что одиночные нейроны или их небольшие группы, которые находятся в проекции большинства исследованных нами ядер, часто имеют невысокую яркость свечения [12]. Потому на фоне компактных групп ярко люминесцирующих клеток ядер шва они или незаметны, или принимаются за нейроны другой медиаторной принадлежности (эффект Бецольда — Брюкке). Прямой иммуноцитохимический метод, использованный нами в работе, позволяет более точно определить топографию и количество СЕН в ядрах.

По нашим данным, доля СЕН в большинстве ядер, входящих в состав так называемого «бульбарного вазомоторного центра», составляет

12–16% от общего числа клеток. В ядрах шва величина этого показателя возрастает до 36–47%. Относительная плотность СЕН, значения которой зависят не только от размеров и количества клеток в ядре, но и от компактности их расположения, в ядрах шва также выше, чем в других ядрах, где такие нейроны располагаются одиночно или образуют группы из ограниченного числа клеток. В ядрах шва определяются и наибольшие цифры ОПП в нейронах, что свидетельствует о высокой концентрации в них серотонина [7].

Вместе с тем, анализ материалов сравнительного исследования показал, что общее количество СЕН, установленное нами в проекции трех ядер шва, уступает величине показателя, вычисленного в клетках всех остальных изученных нами ядер, хотя в нейронах последних существенно ниже средние значения концентрации серотонина. По данным T.J. Gorscs и соавт. [14], также использовавших для идентификации СЕН иммуноцитохимический метод, но в сочетании с ауторадиографическим, общее число таких клеток в вентральном отделе продолговатого мозга колеблется от 575 до 625. Массивные скопления СЕН авторы обнаружили в области ядер IX и X и особенно XII пар черепных нервов. В РГЯ, по нашим подсчетам, общее количество СЕН и содержание в них моноамина сравнимо с соответствующими показателями в отдельных ядрах шва. В нейронах ЯСТ и ДЯБН содержание серотонина наименьшее, однако, и они могут принимать участие в регуляции вазомоторики: микроинъекция серотонина в ЯСТ приводит к изменениям функциональной активности вегетативной нервной системы, артериального давления и частоты сердечных сокращений [4].

Участие NO в функциях нервной системы чаще всего связывают с обеспечением межнейронной связи в качестве эффективного мессенджера, облегчающего высвобождение нейромедиаторов [17]. В таких случаях NO проявляет себя не как большинство медиаторов, оказывающих свое влияние через поверхностные рецепторы клеток-мишеней, а как объемный нейромедиатор, создающий вокруг себя «поле воздействия» [18]. Находясь в таком поле СЕН, образующие в ретикулярном гигантоклеточном ядре нисходящие связи с преганглионарными нейронами спинного мозга, способны оказывать прямое или опосредованное влияние на тонус сосудов [4]. Известно, что снижение синтеза NO сопровождается усилением активности СЕН в ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра, провоцируя вазоконстрикторную реакцию и повышение артериального давления [6, 14]. При этом, наиболее выраженные изменения функциональной актив-

ности СЕН наблюдаются в РЛЯ, РГЯ, РМЯ, т.е. в тех ядрах продолговатого мозга, в которых нами установлено наибольшее количество НЕН.

Между изученными ядрами, а также ядрами и проводящими путями находятся одиночные нейроны. Таких клеток немного (около 2–6% от числа СЕН), но они занимают стратегически важные участки в продолговатом мозгу и, по имеющимся данным, обмениваются многочисленными отростками с ретикулярными ядрами, вегетативным ядром блуждающего нерва, ядром одиночного пути [5]. По сути, эти клетки представляют собой интернейроны, экспрессирующие разные нейротрансмиттеры и нейромодуляторы, что позволяет им выполнять интегративную функцию в отношении клеток и нервных волокон различной функциональной принадлежности. Серотонин в них может быть солокализован не только с NO [3], но и с гамма-аминомасляной кислотой, глицином, вазоинтестинальным пептидом и другими вазоактивными веществами [11, 14].

Таким образом, приведенные нами данные свидетельствуют о вовлечении нейронов различной медиаторной принадлежности в пространственные взаимоотношения между ядрами продолговатого мозга. Участие СЕН и NO-позитивных нейронов в этом процессе обеспечивает им широкие возможности для взаимодействия, создавая необходимые предпосылки для успешного выполнения разнообразных функций мозга, включая регуляцию гемодинамики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьев А.А., Коцюба А.Е. и Черток В.М. Система для автоматизированного анализа изображений микро- и макроструктур Allegro-МС. Тихоокеанский мед. журн., 2002, № 3, с. 65–68.
2. Иззати-заде К.Ф., Баша А.В. и Демчук Н.Д. Нарушения обмена серотонина в патогенезе заболеваний нервной системы. Журн. неврол. и психиатр., 2004, № 9, с. 62–70.
3. Коцюба А.Е. и Черток В.М. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидаергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра человека. Тихоокеанский мед. журн., 2010, № 4, с. 24–27.
4. Маколкин В.И., Подзолков В.И. и Гиляров М.Ю. Серотонинергическая система как звено патогенеза артериальных гипертензий. Клини. мед., 1993, № 6, с. 6–9.
5. Михайлова С.Д. Участие серотонина в формировании деятельности бульбарного сердечно-сосудистого центра. Вестн. Рос. гос. мед. ун-та, 2009, № 1, с. 68–70.
6. Салей А.П. и Рецкий М.И. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения. Вест. ВГУ. Серия химия, биология, фармакология, 2003, № 1, с. 75–80.
7. Уртикова Н.А., Сапронова А.Я., Бризоргей М.-Ж. и др. Развитие серотонинергических нейронов задней группы ядер шва у мышей с генетическим исключением моноаминокси-

- дазы А и ауторецепторов 5-НТ1В. Онтогенез, 2009, т. 40, № 4, с. 270–281.
8. Черток В.М. и Коцюба А.Е. Локальные особенности возрастных изменений нитроксидагических нейронов в некоторых ядрах продолговатого мозга крыс. Онтогенез, 2010, т. 41, № 4, с. 292–299.
 9. Черток В.М., Коцюба А.Е. и Бабич Е.В. Нитроксидагические нейроны в некоторых ядрах продолговатого мозга человека и крысы. Цитология, 2009, т. 51, № 7, с. 612–616.
 10. Bayliss D.A., Li Y.-W. and Talley E.M. Effects of serotonin on caudal raphe neurons: activation of an inwardly rectifying potassium conductance. J. Neurophysiol., 1997, v. 77, № 3, p. 1349–1361.
 11. Cauli B., Tong X.-K., Rancillac A. et al. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. J. Neurosci., 2004, v. 41, № 24, p. 8940–8949.
 12. Chalmers J.P., Minson J.B. and Choy V. Bulbospinal serotonin pathways and hypotensive action of methyl dopa in the rat. Hypertension, 1984, v. 6, № 5, p. 16–21.
 13. Dahlstrom A. and Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. Experientia, 1964, v. 20, № 7, p. 398–399.
 14. Gorcs T.J., Liposits Z., Palay S.L. and Chan-Palay V. Serotonin neurons on the ventral brain surface. Neurobiology, 1985, v. 82, p. 7449–7452.
 15. Halliday G.M., Li Y.W., Joh T.H. et al. Distribution of monoamine-synthesizing neurons in the human medulla oblongata. J. Comp. Neurol., 1988, v. 273, № 3, p. 301–317.
 16. Hope B.T. and Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. J. Neurochem. Cytochem., 1989, v. 37, p. 653–661.
 17. Kimura Y., Hirooka Y., Sagara Y. et al. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. Circ. res., 2005, v. 96, p. 252–260.
 18. Paxinos G. and Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York., Acad. Press, 1998.
 19. Tanaka M., Okamura H., Tamada Y. et al. Catecholaminergic input to spinally projecting serotonin neurons in the rostral ventromedial medulla oblongata of the rat. Brain Res. Bull., 1994, v. 35, № 1, p. 23–30.

Поступила в редакцию 20.04.10

Получена после доработки 02.09.10

SEROTONIN- AND NITROXIDERGIC NEURONS OF RAT MEDULLA OBLONGATA

VM. Chertok, A.Ye. Kotsyuba and Ye.P. Kotsyuba

The purpose of the present work was topochemical mapping of serotonin- and nitroxidergic neurons in medulla oblongata of 12 Wistar rats in eight nuclei involved in so-called «bulbar vasomotor to the center». It was found that a portion of serotonergic neurons lying in a projection of the investigated nuclei, was equal, on the average, to 12–15%, and those in the nuclei of posterior raphe group increased up to 31–43%. Nitroxidergic neurons were distributed more uniformly, and their portion in different nuclei varied from 19 to 49%. 2–6 % of neurons were located between the nuclei, and between the nuclei and conducting pathways; these cells presumably carry out integration functions in hemodynamics regulation.

Key words: *medulla oblongata, nuclei, serotonergic and nitroxidergic neurons, topochemical mapping*

Department of Human Anatomy, Vladivostok State Medical University, and Laboratory of Histophysiology, A.V. Zhirmunskiy Institute of Marine Biology, RAS Far Eastern Branch, Vladivostok